

4

Métodos analíticos empregados na determinação de selênio total em amostras ambientais e biológicas

A determinação dos baixíssimos níveis de selênio encontrados em amostras ambientais e biológicas, geralmente na faixa de microgramas por quilograma, impõe exigências especiais na hora de se selecionar o método a ser empregado, tais como: disponibilidade do equipamento, o tempo e a complexidade do processamento das amostras, a reprodutibilidade, a sensibilidade e o limite de detecção (OMS, 1987).

Dentre os métodos empregados para análise de sub-microgramas de selênio, os mais adequados são a espectrofotometria, a fluorimetria, a análise por ativação de nêutrons e a absorção atômica no forno de grafite ou por geração de hidretos (Vidal, 1984). Na Tabela 6, são encontrados alguns métodos para determinação de traços de selênio e seus respectivos limites de detecção (LD).

Neste trabalho empregou-se o método de Absorção Atômica utilizando-se como técnica de atomização o Forno de Grafite.

Tabela 6. Métodos analíticos para a determinação de selênio em amostras ambientais e biológicas.

Método Analítico ^a	Amostra	L.D. da amostra	Referência
HG-AAS	Sangue	$1 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Clinton, 1977
	Alimentos	$2 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	EPA, 1979a (método 270.3)
	Tecidos biológicos marinhos	$2 \times 10^{-1} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Welz e Melcher, 1985
GF-AAS	Solo	$3 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	EPA, 1997b (método 7742)
	Água	$2 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	EPA, 1979a (método 270.2)
	Fígado e ovos de aves	$4 \times 10^{-1} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Krynitsky, 1987
	Amostra biológica	$1 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Suistomaa et al., 1987
GC-ECD	Sangue, plasma ou tecidos	$1 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	McCarthy et al., 1981
	Amostras biológicas	$1 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Shimoishi, 1977

ICP/AES	Água	0,06 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Adkins et al., 1995
	Soro humano	5,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recknagel et al., 1993
Fluorimétrico	Sangue	$1,2 \times 10^{-3} \mu\text{g.g}^{-1}$	Rongpu et al., 1986
	Plantas	$< 4 \mu\text{g.g}^{-1}$	AOAC, 1984
HGAES-ICP	Amostras Marinhas	$5 \times 10^{-3} \mu\text{g.mL}^{-1}$	DOE, 1987
NAA	Fígado	$2,2 \times 10^{-4} \mu\text{g.g}^{-1}$	Lievens et al., 1977
	Partículas de ar	$1 \times 10^{-4} \mu\text{g/m}^3$	Dams et al., 1970

^a GC-ECD = cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons; GF-AAS = espectrometria de absorção atômica com forno de grafite; HG-AAS = espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto; HGAES-ICP = espectrometria de emissão atômica com geração de hidretos acoplada ao ICP; ICP/AES = espectrometria de emissão atômica com plasma induzido; NAA = análise por ativação de nêutrons.

4.1 Espectrometria de absorção atômica (AAS)

Os métodos para análise de selênio, mais freqüentemente estudados são aqueles baseados na espectrometria de absorção atômica (AAS). Uma variedade de técnicas tem sido descrita (OMS, 1987). A absorção atômica no forno de grafite e a ativação por nêutrons apresentam precisão e exatidão equivalentes, bem como LD da mesma ordem de grandeza. No entanto, a absorção atômica possui vantagens em termos de rapidez e simplicidade, visto ser comum não se dispor de aparelhagem sofisticada exigida pela ativação por nêutrons (Vidal, 1984).

A Espectrometria de Absorção Atômica é, portanto, um método acessível e conveniente para a determinação de traços de selênio. A atomização com chama não fornece a sensibilidade requerida para a maior parte das aplicações em amostras biológicas, pois é útil para materiais com altas concentrações de selênio e não onde são encontrado traços de selênio. Limites de detecção típicos por esta técnica se situam em torno de 1 mg.L^{-1} . Enquanto, para a técnica de atomização eletrotérmica este pode ser cerca de 100 vezes menor (Vidal, 1984; Welz, 1999).

4.1.1 A técnica do forno de grafite

Uma das primeiras aplicações do forno de grafite na determinação de selênio em amostras biológicas foi feita por Ilnat (1974). O pré-tratamento analítico consistia na digestão com $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ e separação do selênio por redução e precipitação com ácido ascórbico. Este autor determinou selênio em concentrações de 60 ng.mL^{-1} (Vidal, 1984).

Na técnica do forno de grafite, um pequeno volume de amostra (5-100 μL) é introduzido por uma micropipeta (ou pipetador automático) no interior de um pequeno tubo de grafite, postado no caminho ótico do aparelho. Esta introdução da amostra é feita através de um pequeno orifício existente na parede do tubo que, por sua vez, sustenta-se em 2 contatos também de grafite. O tubo é aquecido eletricamente, através de um transformador variável programável. O aquecimento se dá em 3 etapas básicas (Figura 14): na primeira (secagem), o tubo é levado a uma temperatura capaz de evaporar o solvente. Na segunda etapa (pirólise), o tubo é levado a uma temperatura, mais alta possível, mas sem que haja volatilização do analito; procura-se assim, eliminar, por volatilização, tantos concomitantes quanto possíveis. Na terceira etapa (atomização), o forno é levado a uma temperatura na qual o analito atomiza-se, formando-se uma nuvem atômica no interior do tubo de grafite, havendo a absorção da radiação característica do elemento. O programador de temperatura permite programar, além da temperatura, a velocidade de aquecimento (ramp) e o tempo em que o forno permanecerá em uma dada temperatura (hold). Embora estas sejam as 3 etapas básicas, um programa pode conter mais etapas, dependendo do analito e da complexidade da matriz. Deve-se ter em mente que para cada analito e matriz, é necessário checar o programa de temperatura ótimo, embora os manuais dos equipamentos forneçam algumas indicações. A técnica do forno de grafite é bem mais sensível do que a de chama, uma vez que o vapor atômico está confinado em um menor volume e tem um maior tempo de residência no caminho ótico. Entretanto, o tempo de análise e as chances de interferência são bem maiores. Estas interferências se dão porque não só o analito, mas também os componentes da matriz estão mais concentrados no interior do forno; daí, a importância da etapa de pirólise onde se tenta simplificar ao máximo a matriz para que, no momento da atomização, as chances

de interferência sejam minimizadas. As dificuldades de controle destas interferências, quase provocaram o abandono da técnica, mas em 1981, foi introduzido por Slavin o conceito STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*) que, se seguido, leva ao sucesso da análise (Welz, 1999). O conceito STPF consiste, fundamentalmente em:

- (i) Proceder a atomização em uma atmosfera isotérmica no tempo e no espaço, o que pode ser conseguido pelo aquecimento rápido do forno no momento da atomização (rampa “zero”), pelo uso da plataforma de L’vov e, mais recentemente, pelo aquecimento transversal do forno;
- (ii) Uso de modificadores químicos, que são agentes que buscam ajudar na simplificação da matriz previamente à atomização; os modificadores podem atuar aumentando a volatilidade da matriz ou, mais freqüentemente, aumentando a estabilidade térmica do analito, permitindo maiores temperaturas de pirólise;
- (iii) Uso de correção de fundo mais eficiente, como o corretor Zeeman;
- (iv) Integração do sinal de absorção (leitura em área); como se trata de um sinal transiente (Figura 15), a leitura em área evita a influência da cinética de atomização, desde que realizada por um sistema de leitura suficientemente rápido (10 a 20 ms);
- (v) Uso do “stop-flow”, isto é, fluxo zero do gás de proteção (geralmente argônio) durante a etapa de atomização, o que aumenta o tempo de residência do vapor do analito no caminho ótico, com aumento conseqüente da sensibilidade e aproxima o forno das condições de isothermicidade;
- (vi) Uso de tubo de grafite recoberto com grafite pirolítico, mais inerte e menos poroso ao vapor atômico (Welz, 1999).

Hoje em dia, o forno de grafite é a técnica mais utilizada para a determinação de traços em amostras biológicas ou ambientais. Entretanto, para bons resultados, o analista sempre deve estar atento a problemas de interferência, checando alguns resultados por adição de analito, por exemplo. O forno apresenta ainda a possibilidade da análise direta de sólidos ou de suspensões, o que contorna

a etapa de abertura de amostras, evitando os riscos de contaminação ou perdas e a diluição a ela associadas.

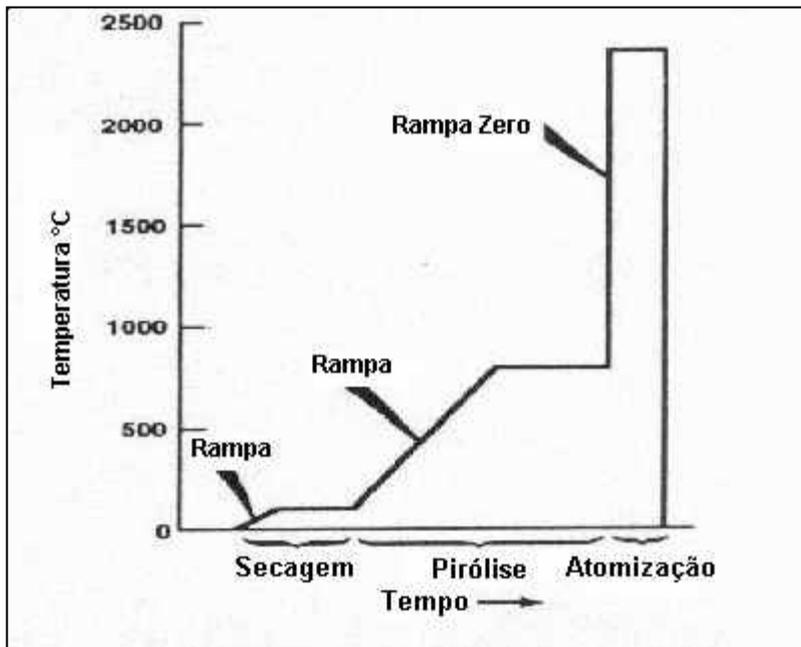


Figura 14. Programa de temperatura.

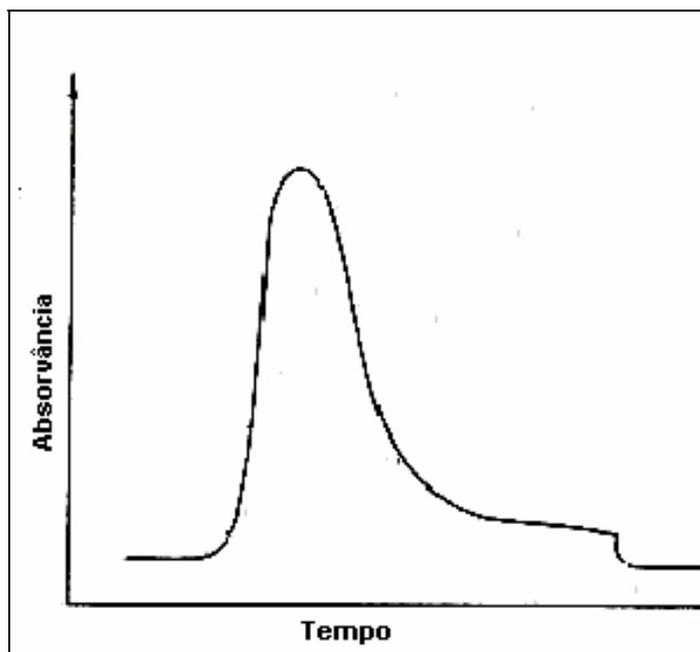


Figura 15. Pulso de absorção: Absorvância x Tempo.